

DE STIKSTOFBEPALING VOLGENS KJELDAHL EN
VOLGENS TER MEULEN IN MELK EN BOTER

DOOR

H. A. SIRKS

(Ingezonden: 26 Januari 1939)

Een tiental jaren geleden werd door H. TER MEULEN¹⁾ in Delft gevonden, dat de N-bepalingen volgens de methode Kjeldahl, toegepast op verschillende levensmiddelen, waaronder ook melk en melkproducten, meermalen lagere waarden gaven dan volgens de (naar hem genoemde) katalytische hydreeringsmethode.

Naar aanleiding hiervan werden eenigen tijd daarna aan dit Proefstation een aantal stikstofbepalingen in melk en boter uitgevoerd volgens beide methoden. Hierbij bleek, dat in verreweg de meeste gevallen met de micro-Kjeldahlmethode een lagere waarde werd gevonden dan met de hydreeringsmethode; dikwijls beperkten deze verschillen zich tot enkele procenten van de gevonden stikstofwaarden, doch ook grotere afwijkingen, vooral bij boter, tot 7 en 9 % toe, kwamen voor.

Om dit nader te onderzoeken en zoo mogelijk de oorzaak van deze afwijkingen op te sporen, werd door mij in een groot aantal monsters volle en afgeroomde melk en ook boter het stikstofgehalte volgens TER MEULEN en KJELDAHL onderzocht.

In de eerste plaats werd de volle melk van een drietal koeien, elk afzonderlijk, met tusschenpoozen van 4 à 8 weken, over een tijdvak van 8 à 9 maanden in onderzoek genomen, terwijl de melk van 2 dezer koeien, die doorgemolken werden, 10 maanden na de eerste bemonstering nog eens werd onderzocht. Dit laatste om te zien of misschien de met de lactatietijd wisselende samenstelling ook van invloed was op mogelijk te vinden verschillen tusschen de genoemde twee methoden. Bovendien werden gedurende den loop van deze proeven ook een paar monsters gemengde melk in dit onderzoek betrokken.

De bepalingen volgens de hydreeringsmethode TER MEULEN werden in al deze monsters verricht op de wijze, zooals door hem uitvoerig is beschreven

¹⁾ *Rec. des Trav. Chim. des Pays-Bas* XLIII pg. 643 (1924).

op blz. 32 e. v. van de 2de druk van zijn „Nieuwe methoden van Elementair-analyse (1930)”. Daarom worden hier slechts vermeld de volgende kleine wijzigingen, die doelmatig zijn gebleken voor het hier gestelde doel. Zoo werd bij de vulling van de kwartsbuis het te reduceeren nikkeloxyd gemengd met 2 gewichtsdeelen van een mengsel van gelijke deelen kort- en langvezelig asbest, daar het voorhanden kortvezelig asbest (Schering—Kahlbaum n°. 1 a) alléén aanleiding gaf tot te veel weerstand in de buis voor de door te leiden waterstof. Verder werd de reductie van het nikkeloxyd bij $\pm 300^{\circ}$ C uitgevoerd, daar het bij 250° te langzaam ging en het nikkelasbest te lang geel bleef. In plaats van het asbestoventje, dat aanvankelijk werd gebruikt, werd later het ook door TER MEULEN aanbevolen samenstel van 2 aluminiumblokken van 12 en 8 cm lengte met doorboring voor de kwartsbuis en holten voor thermometers met succes in gebruik genomen.

Bij de uitvoering van de analyse werd 0,5—0,7 cc van de melk in een porceleinen schuitje van bekend gewicht gedaan, in een gesloten weegglasje gewogen en vervolgens 1 g nikkelformiaat, over het geheele schuitje verdeeld, toegevoegd. De ontwatering van de melk vóór de eigenlijke analyse werd in de kwartsbuis door zéér zachte verwarming in een waterstofstroom gedurende $3/4$ à 1 uur uitgevoerd; later werd ook wel het gewogen schuitje met melk en nikkelformiaat eerst een nacht in vacuo boven zwavelzuur vóórgedroogd. De temperatuur van het asbestoventje of de aluminiumblokken werd gedurende de analyse op $\pm 280^{\circ}$ C gehouden. Na afloop van de ammoniakontwikkeling en het bijdruppelen van N/20 zwavelzuur werd de geringe overmaat daarvan met N/100 natronloog teruggetitreerd; hierbij werden buretten van resp. 5 en 1 cc gebruikt, waarvan de verdeling het schatten van duizendste cc's toeliet. Als indicator werd 1 druppel van een verdund alcoholische methylroodnatrium-oplossing gebruikt, waarvan de concentratie 40 mg per 100 cc bedroeg. Met het gebruikte nikkelformiaat werd een blinde bepaling verricht en in mindering gebracht.

Voor de Kjeldahl-bepalingen werd telkens 5 cc melk, waarvan het gewicht door eenige afzonderlijke uitwegingen van de pipet werd vastgesteld, in bewerking genomen. Gedestruerd werd met 20 cc phosphorzwavelzuur en 1 druppel kwik. De destillatie geschiedde door toevoeging van een overmaat loog met zwavelnatrium, terwijl 50 cc van hetzelfde N/20 zwavelzuur werd voorgelegd als voor de hydreeringsmethode werd gebruikt. Ook hier werd elk monster minstens in duplo onderzocht; de in tabel I opgegeven waarden zijn de gemiddelden daarvan.

Zoals uit de cijfers van tabel I blijkt, is hier voor de twee genoemde methoden een goede overeenstemming gevonden. Van de 23 onderzochte

TABEL I

Datum van monsternamen en onderzoek	Monster afkomstig van	Stikstofgehalte volgens TER MEULEN in %	Stikstofgehalte volgens KJELDAHL in %	Afwijking Kjeldahlcijfers in % der gevonden waarden
6 April 1936	gemengde melk	0,453	0,456	+ 0,66
7 „ 1936	koe n°. 45	0,451	0,452	+ 0,22
14 „ 1936	„ „ 64	0,416	0,415	— 0,24
15 „ 1936	„ „ 6	0,371	0,371	0,00
25 Mei 1936	„ „ 45	0,496	0,495	— 0,20
26 „ 1936	„ „ 64	0,501	0,501	0,00
3 Juni 1936	„ „ 6	0,450	0,449	— 0,22
16 „ 1936	„ „ 45	0,501	0,507	+ 1,20
22 „ 1936	„ „ 64	0,493	0,494	+ 0,20
29 „ 1936	„ „ 6	0,421	0,424	+ 0,71
27 Juli 1936	„ „ 45	0,481	0,484	+ 0,62
29 „ 1936	„ „ 64	0,526	0,530	+ 0,76
3 Aug. 1936	„ „ 6	0,459	0,463	+ 0,87
21 Sept. 1936	gemengde melk	0,539	0,537	— 0,37
21 „ 1936	koe n°. 45	0,523	0,527	+ 0,76
23 „ 1936	„ „ 64	0,568	0,573	+ 0,88
24 „ 1936	„ „ 6	0,495	0,498	+ 0,61
16 Nov. 1936	„ „ 45	0,486	0,489	+ 0,62
17 „ 1936	„ „ 64	0,524	0,528	+ 0,76
23 „ 1936	„ „ 6	0,478	0,482	+ 0,84
29 Dec. 1936	„ „ 64	0,530	0,535	+ 0,94
22 Febr. 1937	„ „ 6	0,564	0,566	+ 0,35
23 „ 1937	„ „ 45	0,548	0,551	+ 0,55

monsters melk was er slechts één, waarvoor het verschil meer bedroeg dan 1 % van het gevonden stikstofcijfer, in alle andere gevallen was het geringer. Deze kleine afwijkingen der Kjeldahlcijfers van de met de hydroeringsmethode gevonden waarden, waren meestal positief; in 4 gevallen negatief. Gemiddeld was het Kjeldahlcijfer $\frac{1}{2}$ % van de volgens TER MEULEN gevonden waarde hooger.

Vervolgens werden de twee methoden ook op eenige monsters boter, bereid in de boterfabriek van de Proefzuivelboerderij, toegepast. Hiervoor werden 150 g boter eenigen tijd op 60° à 70° verwarmd en gemengd met 10 cc van een 20 % natriumcitraatoplossing om de eiwitstoffen beter in het botervocht te verdeelen. Vervolgens werd het vet door centrifugeeren en afhevelen, gevolgd door herhaald naspoelen met een weinig petroleum-aether, dat telkens werd afgeheveld, zoo volledig mogelijk verwijderd. De overblijvende waterige oplossing, 40 à 45 cc bedragende, werd quantitatief met een weinig water in een gewogen kolfje overgebracht en het gewicht bepaald.

Voor elke stikstofbepaling volgens TER MEULEN werd ± 1 cc van de goed gemengde oplossing, die meestal nog een spoor vet bevatte, in een schuitje afgewogen, 0,8 g nikkelformiaat toegevoegd en verder als bij de analyse van melk behandeld.

Voor de bepaling volgens KJELDAHL werd telkens 10 cc oplossing, waarvan het gewicht door afzonderlijke wegingen werd bepaald, afgemeten en als vroeger de analyse uitgevoerd. De beide N-bepalingen werden dus in gedeelten van dezelfde oplossing, van 150 g boter afkomstig, uitgevoerd, wat voor een nauwkeurige vergelijking der twee methoden een voordeel is.

De uitkomsten dezer analyses, gemiddelden van minstens 2 bepalingen, vindt men in Tabel II vereenigd, waaruit blijkt, dat bij deze botermonsters verschillen van beteekenis tusschen de twee methoden niet werden gevonden, daar het grootste verschil 0,7 % bedroeg van de stikstofwaarde. De geringe afwijkingen der Kjeldahl-cijfers ten opzichte van de hydroeringscijfers waren zoowel positief als negatief.

TABEL II

Boter onderzocht op	Boter bereid op	Stikstof-gehalte volgens TER MEULEN in %	Stikstof-gehalte volgens KJELDAHL in %	Afwijking Kjeldahlcijfers in % der gevonden waarden
2 Mrt. 1937	25 Feb. 1937	0,0970	0,0967	— 0,31
9 „ 1937	6 Mrt. 1937	0,0954	0,0947	— 0,73
15 „ 1937	6 „ 1937	0,0959	0,0960	+ 0,10
22 „ 1937	22 „ 1937	0,0994	0,0998	+ 0,40

De vraag doet zich nu voor, waardoor volgens de vroegere in de jaren '29 en '30 in melk en boter verrichte bepalingen de methode KJELDAHL meestal min of meer lagere waarden gaf dan de methode TER MEULEN, terwijl dit bij het onderzoek in de tabellen I en II vermeld niet het geval was.

Nu is bij dit laatste onderzoek steeds gebruik gemaakt van de macro-Kjeldahlbepaling met phosphorzwavelzuur en kwik, terwijl vroeger steeds micro-Kjeldahlbepalingen volgens PREGL waren verricht, waarbij voor de destructie van kaliumsulfaat en kopersulfaat gebruik werd gemaakt, welk verschil in behandeling misschien invloed heeft gehad op de stikstofcijfers volgens KJELDAHL.

Om dit verder na te gaan werden, zoowel in een aantal monsters centrifugemelk als boter, de micro- en de macro-Kjeldahlbepalingen naast elkaar uitgevoerd en wel de micro-bepalingen op de wijze, zooals deze vroeger bij het onderzoek in '29 en '30 werden verricht.

Voor het afwegen der melk werd de volgende weg gekozen: \pm 50 cc daarvan werd gewogen en met water in een gewogen maatkolf van 500 cc overgebracht, waarna werd aangevuld met water en gemengd en van dit mengsel het gewicht vastgesteld. Voor de micro-Kjeldahlbepaling werd

hiervan ± 2 cc in een gewogen destructiebuisje gebracht, het gewicht bepaald en met 1 cc sterk zwavelzuur, een weinig K_2SO_4 en enkele kristalletjes kopersulfaat gedestruerd en verder volgens PREGL gehandeld. Wat de macro-Kjeldahl betreft, hierbij werd in een gewogen hoeveelheid van 50 cc van dezelfde verdunde melk op de gewone wijze, dus met phosphorzwavelzuur en kwik het stikstofgehalte bepaald.

De micro-bepaling volgens KJELDAHL in de botermonsters geschiedde op de door B. HOLWERDA¹⁾ aangegeven wijze, waarbij van ± 1 g boter, afgewogen in een destructiebuisje wordt uitgegaan en waarbij met zwavelzuur, kaliumsulfaat en kopersulfaat wordt gedestruerd, nadat, na voorbehandeling der boter met zwavelzuur 1 : 1, de groote overmaat vet met behulp van petroleumaether was verwijderd, en de verdere behandeling volgens PREGL geschiedde. Waterstofsperoxyd werd niet gebruikt.

De macro-Kjeldahlbepaling in boter had, wat de voorbereiding betreft op gelijksoortige wijze plaats als bij de micro-bepaling, dus door verwarmen van de boter (hier 30 g) met zwavelzuur (hier 15 cc zuur 1 : 1), oplossen van het vet in petroleumaether, centrifugeeren, afhevelen van de petroleum-aether en de behandeling met petroleum-aether nog eens herhalen. Na verdrijving der restjes petroleum-aether met lucht werd de waterige oplossing quantitatief in een Kjeldahlkolf gebracht en na toevoeging van phosphorzwavelzuur en kwik als gewoonlijk gedestruerd en afgedistilleerd.

Het resultaat van al deze Kjeldahl-bepalingen, minstens in duplo verricht, vindt men in Tabel III vereenigd.

TABEL III

Monster onderzocht op	Aard van het monster	Macro-Kjeldahl met phospherzw. en Hg. N in %	Micro-Kjeldahl met zwavelz., K_2SO_4 en $CuSO_4$ N in %	Afwijking der micro- van de macro-bepaling in % der gemidd. waarde
18 Mei 1937	Centrifugemelk	0,524	0,510	— 2,71
21 " 1937	"	0,516	0,503	— 2,55
28 " 1937	"	0,520	0,508	— 2,33
3 Juni 1937	"	0,476	0,466	— 2,12
5 Mei 1937	boter v. 3/5 '37	0,0924	0,0906	— 1,95
7 " 1937	" " 13/4 '37	0,0930	0,0924	— 0,65
10 " 1937	" " 10/5 '37	0,0884	0,0868	— 1,83
12 " 1937	" " 12/5 '37	0,0922	0,0901	— 2,30
20 " 1937	" " 19/5 '37	0,0883	0,0857	— 2,99
24 " 1937	" " 22/5 '37	0,0744	0,0729	— 2,04
7 Juni 1937	" " 3/6 '37	0,0950	0,0901	— 5,30
14 " 1937	" " 3/6 '37	0,0947	0,0922	— 2,67

¹⁾ Chem. Weekblad 1928 blz. 102.

Uit deze cijfers blijkt, dat bij al de onderzochte monsters melk en boter de micro-Kjeldahl-bepalingen, op de aangegeven wijze uitgevoerd, lagere waarden hebben gegeven dan de macro-bepalingen; voor de melkmonsters bedroeg het verschil gemiddeld 2,4 % van de gevonden stikstofwaarde, voor de boter 2,5 %. Dat de macro-bepalingen zooveel te hooge waarden zouden kunnen geven is onwaarschijnlijk, te meer daar deze werkwijze volgens de analyses van Tabel I een behoorlijke overeenstemming gaf met de hydreeringsmethode volgens TER MEULEN, bij welke methode te hooge uitkomsten evenmin kunnen worden verwacht. De verklaring van de verschillen in Tabel III en ook, voor een deel althans, van de in '29/'30 gevonden verschillen tusschen de micro-Kjeldahl-bepalingen en de bepalingen volgens de hydreeringsmethode zal dus hierin gezocht moeten worden, dat de micro-bepalingen met behulp van kalium- en kopersulfaat voor melk en boter licht te lage waarden geven, doordat niet alle stikstof in ammoniumsulfaat wordt overgevoerd, zoodat men veiliger werkt door de destructie, ook bij de micro-Kjeldahlbepalingen, met phosphorzwavelzuur en kwik uit te voeren.

In zijn „Quantitatieve organische Micro-analyse” (2de druk 1923, blz. 121) heeft PREGL daar trouwens reeds op gewezen, waar hij zegt: „in selteneren Fällen, namentlich bei gewissen Eiweiskörpern ist Quecksilber, am besten in Form von Quecksilbersulfat, notwendig um die Stickstoffmengen in Ammoniak überzuführen”.

Hiermee in overeenstemming zijn de uitkomsten van eenige micro-Kjeldahl-bepalingen, met behulp van phosphorzwavelzuur en kwik verricht naast die, waarbij kopersulfaat was gebruikt in enkele van de in Tabel III genoemde monsters.

Zoo werd in de centrifugemelk van 28 Mei '37, waarin volgens de micro-Kjeldahl-bepaling met kopersulfaat 0,508 % stikstof aanwezig was, onder gebruikmaking van kwik 0,518 % gevonden, dus ongeveer 2 % van de van de stikstofwaarde hooger en nu goed overeenstemmend met de macro-Kjeldahl-bepaling (0,520 %). Ook in de melk van 3 Juni van Tabel III werd tevens een micro-bepaling verricht met kwik als katalysator, hetgeen 0,480 % stikstof opleverde, dus weer duidelijk meer dan met kopersulfaat (0,466 %) en behoorlijk overeenstemmend met het resultaat der macro-bepaling (0,476 %).

In het botermonster van 3 Juni '37, waarvoor bij 2, elk in duplo uitgevoerde micro-analyses met behulp van kopersulfaat op 7 en 14 Juni, resp. 0,0901 % en 0,0922 % N was gevonden, waren ook evenveel micro-Kjeldahl-bepalingen met kwik verricht, die resp. 0,0942 % en 0,0949 % tot uitkomst hadden, dus onderling beter kloppend en weer enkele procenten van het

gevonden N-cijfer hooger dan de analyses met kopersulfaat, terwijl de overeenstemming met de macro-bepalingen (0,0950 % en 0,0947 %) weer goed was.

Uit deze bepalingen blijkt duidelijk, dat de destructie met kopersulfaat lagere cijfers kan geven dan met kwik, zoodat het gebruik van de eerstgenoemde katalysator bij de stikstofbepaling in melk en boter zal moeten worden vermeden.

SAMENVATTING

Volgens vroegere hier en elders gedane waarnemingen waren met de Kjeldahl-methode bij de stikstofbepaling in melk en melkproducten meer malen lagere cijfers gevonden dan met de tegenwoordig veel toegepaste hydroeringsmethode volgens TER MEULEN, waarvan moeilijk is aan te nemen, dat zij te hooge waarden zou geven.

Bij een onderzoek naar de oorzaken van dit waarschijnlijk tekort aan gevonden stikstof bij de Kjeldahl-methode bleek door de analyse van een groot aantal monsters melk en boter, dat wanneer de macro-Kjeldahl-methode, waarbij de destructie met phosphorzwavelzuur en kwik werd verricht, naast de methode TER MEULEN werd uitgevoerd, geregeld goede overeenstemming werd gevonden, maar dat de Pregl'sche micro-Kjeldahl-methode, wanneer zij, zooals vroeger veelal het geval was geweest, met kopersulfaat als katalysator werd uitgevoerd, in vergelijking met de macro-Kjeldahl-methode met kwik steeds te lage cijfers gaf.

Bovendien bleek bij eenige monsters melk en boter, dat de micro-Kjeldahl-bepalingen, wanneer zij met kwik werden verricht, een behoorlijke overeenstemming met de macro-bepalingen vertoonden.

De vroeger hier en elders met de micro-Kjeldahl-methode geconstateerde negatieve verschillen ten opzichte van de hydroeringsmethode volgens TER MEULEN zijn dus waarschijnlijk voor het grootste deel aan het gebruik van kopersulfaat bij het destrueeren te wijten, zoodat het aanbeveling verdient dit bij de stikstofbepalingen in melk en melkproducten door kwik te vervangen.

SUMMARY

ESTIMATION OF NITROGEN BY THE KJELDAHL METHOD AND THE HYDROGENATION METHOD OF TER MEULEN IN MILK AND BUTTER

The observation made in former years at this Station and elsewhere, that the nitrogen values found by the Kjeldahl-method in milk and milk-

products often were lower than those found by the at present frequently applied hydrogenation method of TER MEULEN, which most likely does not give too high results, gave rise to a nearer investigation concerning the cause of this nitrogen deficit of the first named method.

In estimating the nitrogen content by the usual macro-Kjeldahl-method with mercury as a catalyst and by the TER MEULEN method in a large number of milk- and buttersamples, it appeared that these methods agreed very well.

On the contrary the results with the micro-Kjeldahl-method by PREGL carried out, as generally is done, with coppersulphate as a catalyst always were lower than those with the macro-Kjeldahl-method.

Moreover, in analysing some samples of milk and butter, it was found that the micro-Kjeldahl-method no longer disagreed with the macro-Kjeldahl-method if only mercury was used in both of them. From these experiments it follows, that the formerly often found differences between the micro-Kjeldahl and TER MEULEN methods probably are due to the use of coppersulphate, and that in applying PREGL's-micronitrogen determination to milk and milkproducts one should perform the destruction with use of a minute drop of mercury.